



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 198 24 230 A 1

21 Aktenzeichen: 198 24 230.1
22 Anmeldetag: 29. 5. 98
43 Offenlegungstag: 2. 12. 99

51 Int. Cl.⁶:
C 07 K 16/00
C 07 K 14/435
A 61 K 39/395
C 12 N 15/11
C 07 H 21/04
C 12 N 15/63
C 12 N 5/10
C 12 N 1/00
A 61 K 48/00
A 61 K 38/17
C 12 Q 1/68
// G01N 33/53,33/68

DE 198 24 230 A 1

71 Anmelder:
Starzinski-Powitz, Anna, Prof. Dr., 60318 Frankfurt,
DE
74 Vertreter:
H. Weickmann und Kollegen, 81679 München
72 Erfinder:
Starzinski-Powitz, Anna, Prof. Dr., 60318 Frankfurt,
DE; Kotzian, Silvia, Dipl.-Biol., 65795 Hattersheim,
DE; Handrow-Metzmacher, Heike, Dipl.-Biol., 60433
Frankfurt, DE

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
zu ziehende Druckschriften:
DE 195 48 122 A1
WO 96 40 720 A1
WO 95 16 466 A1
WO 94 05 268 A1
Chemical Abstracts:
Vol.128, 1998, Ref. 320180d;
Vol.128, 1998, Ref. 317648g;
Vol.127, 1997, Ref. 277204e;
Vol.127, 1997, Ref. 203718d;
Vol.127, 1997, Ref. 107447u;
Vol.126, 1997, Ref. 184658v;
Vol.120, 1994, Ref. 103448c;
BIOSIS:
Ref. 98:264048;
Ref. 97:414944;
MEDLINE:
Ref. 97264341;
Ref. 96207227;
EMBL, Ref. AL023586;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- 54 Neues Endometriose-assoziiertes Gen
57 Die vorliegende Erfindung betrifft ein mit invasiven
Prozessen, z. B. Endometriose assoziiertes Gen, ein davon
kodierte Polypeptid, einen gegen das Polypeptid gerich-
teten Antikörper sowie die pharmazeutische Anwendung
der Nukleinsäure, des Polypeptids und des Antikörpers.

DE 198 24 230 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein mit invasiven Prozessen, z. B. Endometriose assoziiertes Gen, ein davon kodiertes Polypeptid, einen gegen das Polypeptid gerichteten Antikörper sowie die pharmazeutische Anwendung der Nukleinsäure, des Polypeptids und des Antikörpers.

Die Endometriose ist die zweithäufigste Frauenkrankheit und wird als das Vorkommen von Gebärmutter-schleimhautzellen außerhalb der Gebärmutter definiert. Von der Endometriose ist etwa jede fünfte Frau im reproduktionsfähigen Alter betroffen, bei Frauen mit Fruchtbarkeitsproblemen sogar jede zweite.

Unter normalen Umständen findet sich Gebärmutter-schleimhaut (Endometrium) ausschließlich in der Gebärmutter. Bei der Endometriose-Erkrankung findet man außerhalb der Gebärmutter Gewebe, das histologisch wie Gebärmutter-schleimhaut aussieht, beispielsweise außen an der Gebärmutter, am Darm oder sogar in der Bauchspeicheldrüse oder Lunge. Obwohl diese Endometriose-Herde außerhalb der Gebärmutter lokalisiert sind, bluten sie ebenfalls während der Menstruation, werden also durch die Hormone des weiblichen Zyklus beeinflusst. Da die Endometriose-Herde ebenso wie die Gebärmutter-schleimhaut im Zyklus Volumenänderungen durchlaufen, können je nach Lokalisation durch diese Veränderungen Schmerzen verursacht werden. Darüber hinaus reagiert der Körper mit einer Entzündungsreaktion auf die Endometriose-Zellen, was wiederum Schmerzen auslöst. Weiterhin führt die Entzündung zu Verwachsungen im Bereich der Eierstöcke und Eileiter und ist hierdurch verantwortlich für eine sog. mechanische Sterilität der betroffenen Frauen. Offenbar werden bei der Endometriose jedoch auch Botenstoffe (z. B. Zytokine, Prostaglandine) freigesetzt, die selbst bei nichtvorhandenen Verwachsungen die Fertilität der betroffenen Frauen mindern können.

Aufgrund ihrer patho-biologischen Eigenschaften könnte man Endometriose-Zellen zwischen normale Zellen und Tumorzellen einordnen: Einerseits zeigen sie kein neoplastisches Verhalten, andererseits haben sie jedoch wie metastasierende Tumorzellen die Fähigkeit, sich organsgrenzüberschreitend im Organismus zu bewegen und in andere Organe einzuwachsen, d. h. sie zeigen invasives Verhalten. Aus diesem Grunde werden Endometriose-Zellen in der Literatur als "gutartige Tumorzellen" definiert, obwohl in derartigen Zellen bisher keine tumorspezifischen Mutationen in Proto-Onkogenen gefunden wurden.

Da bis heute die Pathogenese der Endometriose noch völlig ungeklärt ist, gibt es bisher noch keine wirksame Therapie- oder Präventionsmöglichkeiten von Endometriose-assoziierten Krankheiten.

Der Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, neue Gene zu identifizieren, die bei invasiven Prozessen eine Rolle spielen und die mit dem pathophysiologischen Phänotyp der Endometriose assoziiert sein können.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch die Identifizierung, Klonierung und Charakterisierung eines Gens, das als Endometriose-assoziiertes Gen bezeichnet wird und für ein Polypeptid kodiert. Diese Gensequenz wurde mit Hilfe der Differential-Display-RT-PCR (Liang und Pardee, Science 257 (1992), 957-971) entdeckt. Hierzu wurden invasive und nichtinvasive Varianten einer Endometriosezelllinie miteinander verglichen. Dabei stieß man auf eine cDNA-Sequenz, welche spezifisch für die invasive Variante der Endometriose-Zellen ist. Man fand eine zugehörige RNA von 4 kb Länge. Eine entsprechende aus einer cDNA-Phagenbank isolierte cDNA weist einen offenen Leserahmen (ORF) von 302 Aminosäuren auf.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, welche

- (a) die in SEQ ID NO. 1 dargestellte Nukleotidsequenz oder einen Proteinkodierenden Abschnitt davon,
- (b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz oder
- (c) eine mit den Sequenzen aus (a) und/oder (b) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

Diese Nukleinsäure kodiert vorzugsweise für ein Polypeptid, das mit invasiven Prozessen assoziiert ist, oder einen Abschnitt davon.

In der EMBL-EST-Datenbank sind die folgenden Nukleotidsequenzen mit den folgenden Zugriffsnummern abgelegt: Z98886, Ac003017, Aa452993, Aa452856. Diese Sequenzen stellen keine erfindungsgemäßen Nukleinsäuren dar. Die ersten beiden dieser Sequenzen sind DNAs, die aus Menschenhirn isoliert wurden und jeweils mit den Abschnitten von Nukleotid 970 bis ca. 2000 und von 760 bis ca. 1450 eine über 90%ige Basenidentität zeigen mit SEQ ID NO. 1.

Die Sequenzen Aa452993 und Aa452856 stammen aus Mausembryonen und zeigen Basenidentität mit den Nukleotiden von ca. 1060 bis ca. 1450 bzw. von ca. 24 bis 440 von SEQ ID NO. 1. Keiner dieser 4 Sequenzen ist bisher ein Leseraster oder eine Funktion zugeordnet worden.

Die in SEQ ID NO. 1 dargestellte Nukleotidsequenz enthält einen offenen Leserahmen, welcher einem Polypeptid mit einer Länge von 302 Aminosäuren entspricht (SEQ ID NO. 2). Dieses Polypeptid ist in der SEQ ID NO. 2 dargestellten Aminosäuresequenz angegeben. SEQ ID NO. 2 stellt einen Abschnitt des C-terminalen Endes des nativen Polypeptids dar.

Neben der in SEQ ID NO. 1 gezeigten Nukleotidsequenz und einer dieser Sequenz im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt die vorliegende Erfindung auch Nukleotidsequenzen, die mit einer der zuvor genannten Sequenzen hybridisieren. Der Begriff "Hybridisierung" gemäß vorliegender Erfindung wird bei Sambrook et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), 1.101-1.104) verwendet. Vorzugsweise spricht man von einer stringenten Hybridisierung, wenn nach dem Waschen für eine Stunde mit 1xSSC und 0,1% SDS bei 50°C, vorzugsweise bei 55°C, besonders bevorzugt bei 62°C und am meisten bevorzugt bei 68°C, insbesondere für 1 h in 0,2xSSC und 0,1% SDS bei 55°C, vorzugsweise bei 55°C, besonders bevorzugt bei 62°C und am meisten bevorzugt bei 68°C noch ein positives Hybridisierungssignal beobachtet wird. Eine unter derartigen Waschbedingungen mit der in SEQ ID NO. 1 gezeigten Nukleotidsequenz oder einer dieser Sequenz im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechenden Nukleotidsequenz hybridisierende Nukleotidsequenz ist eine erfindungsgemäße Nukleotidsequenz.

Vorzugsweise ist die erfindungsgemäße Nukleotidsequenz eine DNA. Sie kann jedoch auch eine RNA oder ein Nukleinsäureanalogon, wie etwa eine peptidische Nukleinsäure, umfassen. Besonders bevorzugt umfaßt die erfindungsgemäße Nukleinsäure einen Protein-kodierenden Abschnitt der in SEQ ID NO. 1 dargestellten Nukleotidsequenz oder eine Sequenz, die eine Homologie von mehr als 80%, vorzugsweise mehr als 90% und besonders bevorzugt mehr als 95% zu der in SEQ ID NO. 1 dargestellten Nukleotidsequenz oder einen vorzugsweise mindestens 20 Nukleotide (nt) und besonders bevorzugt mindestens 50 nt langen Abschnitt davon aufweist. 5

Erfindungsgemäße Nukleinsäuren sind vorzugsweise aus Säugern und insbesondere aus dem Menschen erhältlich. Sie können nach bekannten Techniken unter Verwendungen kurzer Abschnitte der in SEQ ID NO. 1 gezeigten Nukleotidsequenz als Hybridisierungs sonden und/oder als Amplifikationsprimer isoliert werden. Weiterhin können erfindungsgemäße Nukleinsäuren auch durch chemische Synthese hergestellt werden, wobei anstelle der üblichen Nukleotidbausteine gegebenenfalls modifizierte Nukleotidbausteine, z. B. 2'-O-alkylierte Nukleotidbausteine eingesetzt werden können. 10

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind die von einer wie oben definierten Nukleinsäure kodierten Polypeptide. Diese Polypeptide enthalten vorzugsweise

- (a) die in SEQ ID NO. 2 dargestellte Aminosäuresequenz oder 15
- (b) eine Homologie von mehr als 70%, vorzugsweise von mehr als 80% und besonders bevorzugt von mehr als 90% zu der Aminosäuresequenz gemäß (a).

Neben den in SEQ ID NO. 2 dargestellten Polypeptiden betrifft die Erfindung auch Muteine, Varianten und Fragmente davon. Darunter sind Sequenzen zu verstehen, die sich durch Substitution, Deletion und/oder Insertion einzelner Aminosäuren oder kurzer Aminosäureabschnitte von den in SEQ ID NO. 2 dargestellten Aminosäuresequenzen unterscheiden. 20

Unter den Begriff "Variante" fallen sowohl natürlich vorkommende allelische Variationen oder Spleißvariationen des Endometrioseproteins, sowie durch rekombinante DNA-Technologie (insbesondere in vitro-Mutagenese mit Hilfe von chemisch synthetisierten Oligonukleotiden) erzeugte Proteine, die hinsichtlich ihrer biologischen und/oder immunologischen Aktivität den in SEQ ID NO. 2 dargestellten Proteinen im wesentlichen entsprechen. Ebenfalls fallen unter diesen Begriff auch chemisch modifizierte Polypeptide. Hierzu gehören Polypeptide, die an den Termini und/oder an reaktiven Aminosäureseitentgruppen durch Acylierung, z. B. Acetylierung oder Amidierung, modifiziert sind. Zu den erfindungsgemäßen Aminosäuresequenzen gehören auch Polypeptidfragmente (Peptide), die einen mindestens 10 Aminosäuren langen Abschnitt der in SEQ ID NO. 2 gezeigten Aminosäuresequenz darstellen. 25

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Vektor, der mindestens eine Kopie einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure enthält. Dieser Vektor kann ein beliebiger prokaryontischer oder eukaryontischer Vektor sein, auf dem sich die erfindungsgemäße DNA-Sequenz vorzugsweise in Verbindung mit Expressionssignalen, wie etwa Promotor, Operator, Enhancer etc. befindet. Beispiele für prokaryontische Vektoren sind chromosomale Vektoren, wie etwa Bakteriophagen, und extrachromosomale Vektoren, wie etwa Plasmide, wobei zirkuläre Plasmidvektoren besonders bevorzugt sind. Geeignete prokaryontische Vektoren sind z. B. bei Sambrook et al., supra, Kapitel 1-4, beschrieben. Besonders bevorzugt ist der erfindungsgemäße Vektor ein eukaryontischer Vektor, z. B. ein Hefevektor, oder ein für höhere Zellen geeigneter Vektor, z. B. ein Plasmidvektor, viraler Vektor oder Pflanzenvektor. Derartige Vektoren sind dem Fachmann auf dem Gebiet der Molekularbiologie geläufig, so daß hier nicht näher darauf eingegangen werden muß. Insbesondere wird in diesem Zusammenhang auf Sambrook et al., supra, Kapitel 16, verwiesen. 30

Die Erfindung betrifft auch einen Vektor, der einen mindestens 21 Nukleotide langen Abschnitt der in SEQ ID NO. 1 dargestellten Sequenz erhält. Vorzugsweise besitzt dieser Abschnitt eine Nukleotidsequenz, die aus dem Nukleotid-kodierenden Bereich der in SEQ ID NO. 1 dargestellten Sequenz oder einem für die Expression des Proteins wesentlichen Bereich stammt. Diese Nukleinsäuren eignen sich besonders zur Herstellung von therapeutisch einsetzbaren Antisense-Nukleinsäuren, die vorzugsweise bis zu 50 Nukleotide lang sind. 40

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Zelle, die mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure oder einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert ist. Die Zelle kann sowohl eine eukaryontische als auch eine prokaryontische Zelle sein. Verfahren zur Transformation von Zellen mit Nukleinsäuren sind allgemeiner Stand der Technik und brauchen daher nicht näher erläutert zu werden. Beispiele für bevorzugte Zellen sind eukaryontische Zellen, insbesondere tierische und besonders bevorzugt Säugerzellen. 45

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Antikörper gegen das vom Endometriosegen kodierte Protein oder Varianten davon. Besonders bevorzugt sind derartige Antikörper gegen die gesamten Polypeptide oder gegen eine Peptidsequenz gerichtet, die den Aminosäuren 1-302 der in SEQ ID NO. 2 dargestellten Aminosäuresequenz entspricht. 50

Die Identifizierung, Isolierung und Expression eines erfindungsgemäßen Gens, das speziell mit invasiven Prozessen und insbesondere mit der Endometriose assoziiert ist, liefert die Voraussetzungen für die Diagnostik, Therapie und Prävention von Erkrankungen, die auf derartigen oben genannten Störungen beruhen. 55

Mit Hilfe eines erfindungsgemäßen Polypeptids oder Fragmenten dieses Polypeptids als Immunogen wird es möglich, Antikörper gegen derartige Polypeptide herzustellen. Die Herstellung von Antikörpern kann dabei auf übliche Weise durch Immunisierung von Versuchstieren mit dem vollständigen Polypeptid oder Fragmenten davon und anschließende Gewinnung der resultierenden polyklonalen Antiseren erfolgen. Nach der Methode von Köhler und Milstein und deren Weiterentwicklungen können aus den Antikörper-produzierenden Zellen der Versuchstiere auf bekannte Weise durch Zellfusion monoklonale Antikörper erhalten werden. Ebenso können nach bekannten Methoden humane monoklonale Antikörper hergestellt werden. Derartige Antikörper könnten dann sowohl für diagnostische Tests, insbesondere von Endometriosezellgewebe, oder auch für die Therapie verwendet werden. Diagnostische Untersuchungen können auch mit Hilfe spezifischer Nukleinsäuresonden zum Nachweis auf Nukleinsäureebene, z. B. auf Gen- oder Transkriptebene, durchgeführt werden. 60

Weiterhin ermöglicht die Bereitstellung der erfindungsgemäßen Nukleotid- und Aminosäuresequenzen eine gezielte Suche nach Effektoren der Polypeptide/Proteine. Effektoren sind Stoffe, die auf das erfindungsgemäße Polypeptid inhi-

bitorisch oder aktivierend wirken, und die in der Lage sind, die durch die Polypeptide gesteuerten Zellfunktionen selektiv zu beeinflussen. Diese können dann bei der Therapie von entsprechenden Krankheitsbildern, wie etwa solchen, die auf invasiven Prozessen beruhen, eingesetzt werden. Ein Gegenstand der Erfindung ist somit auch ein Verfahren zur Identifizierung von Effektoren der Endometrioseproteine, wobei man Zellen, die das Protein exprimieren, mit verschiedenen potentiellen Effektorsubstanzen, z. B. niedermolekularen Stoffen, in Kontakt bringt und die Zellen auf Veränderungen, z. B. zellaktivierende, zellinhibierende, zellproliferative und/oder zellgenetische Veränderungen, analysiert. Auf diese Weise lassen sich auch Bindetargets der Endometrioseproteine identifizieren.

Da viele Tumorerkrankungen mit invasiven Prozessen einhergehen, liefert die Entdeckung des Gens gemäß der Erfindung zusätzlich Möglichkeiten für die Diagnose, Prävention und Therapie von krebsartigen Krankheiten.

Die Entdeckung eines Gens, welches für invasive Prozesse mit verantwortlich ist, eröffnet nicht nur Möglichkeiten zur Behandlung von Krankheiten, die auf derartigen Zellveränderungen beruhen, sondern es können die erfindungsgemäßen Sequenzen auch verwendet werden, um sich derartige Prozesse nutzbar zu machen. Dies könnte beispielsweise bei der Implantation von Embryonen von Bedeutung sein.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit ebenfalls eine pharmazeutische Zusammensetzung, die als aktive Komponenten Nukleinsäuren, Vektoren, Zellen, Polypeptide, Peptide und/oder Antikörper, wie zuvor angegeben, umfaßt.

Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung kann weiterhin pharmazeutisch übliche Träger-, Hilfs- und/oder Zusatzstoffe, sowie gegebenenfalls weitere aktive Komponenten enthalten. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann insbesondere zur Diagnostik, Therapie oder Prävention von Erkrankungen eingesetzt werden, die mit invasiven Prozessen assoziiert sind. Weiterhin kann die erfindungsgemäße Zusammensetzung auch zur Diagnostik einer Prädisposition für solche Erkrankungen eingesetzt werden, insbesondere bei der Diagnostik eines Risikos für Endometriose.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele und Sequenzprotokolle näher erläutert.

SEQ ID NO. 1:

stellt eine Nukleotidsequenz dar, die für das Endometriose-assoziierte Gen kodierende genetische Information enthält, wobei ein offener Leserahmen von Nukleotid 3 bis 911 reicht, und

SEQ ID NO. 2:

stellt die Aminosäuresequenz des offenen Leserahmens der in SEQ ID NO. 1 gezeigte Nukleotidsequenz dar, wobei die Aminosäuresequenz des offenen Leserahmens von Aminosäure 1 bis 302 reicht.

Beispiele

Beispiel 1

Kultivierung von Zellen

Zur Identifizierung eines Endometriose-assoziierten Gens wurden invasive und nicht-invasive Zellen der epithelialen Endometriosezelllinie EEC145T⁺ verwendet. Die Zellen wurden in Dulbecco-Medium (DMEM) mit 10% fetalem Kälberserum kultiviert und 2x pro Woche 1 : 5 verdünnt (Passage). Für den Vergleich der Expressionsmuster mittels DDRT-PCR (siehe unten) wurden invasive Zellen der Passage 17 und nicht invasive Zellen der Passage 33 verwendet. Die Zellen wurden mit SV40 transformiert und durch Differential Display Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (DDRT-PCR) analysiert.

Beispiel 2

DDRT-PCR

Bei dieser von Liang und Pardee entwickelten Methode handelt es sich um ein Verfahren zur Unterscheidung der Expressionsmuster verschiedener Zellarten oder des wechselnden Expressionsmusters einer Zellart unter verschiedenen Lebensbedingungen oder während wechselnder Entwicklungsstadien (Liang und Pardee (1992), Science 257, 967-971). Die Grundlage der DDRT-PCR-Technik basiert auf der Überlegung, daß in jeder Zelle etwa 15 000 Gene exprimiert werden und prinzipiell jedes einzelne mRNA-Molekül mittels reverser Transkription und Amplifikation mit zufälligen Primern dargestellt werden kann.

In diesem Beispiel wurde die zelluläre PolyA⁺-RNA zunächst mit Hilfe mehrerer verschiedener dT₁₁VX-Primer (Downstream-Primer, Ankerprimer) in cDNA umgeschrieben. Die resultierenden cDNA-Populationen wurden dann mit 4 Downstream- und 20 Upstream-Primern aus dem RNA-MapTM-Kit der Firma Genhunter, Nashville (1994), unter Zugabe eines radioaktiv markierten Nukleotids PCR-amplifiziert. Nach der Amplifikation wurden die Reaktionsansätze im Vakuum eingengt und die erhaltenen cDNA-Fragmente in einem sechsprozentigen nativen PAA-Gel (Polyacrylamid) aufgetrennt. Die DNA-Detektion erfolgte durch Autoradiographie. PCR-Ansätze, die für die beiden zu untersuchenden Zellvarianten deutliche Unterschiede im Bandenmuster zeigten, wurden zweifach wiederholt, um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen. Bestätigten sich die zuvor gefundenen Unterschiede, wurden die Banden nach bekannten Verfahren aus dem Gel eluiert, reamplifiziert, kloniert und sequenziert.

Durch diese Methode fand man ein 394 bp langes Fragment (Fragment 1, Nukleotide 1235 bis 1628 der in SEQ ID NO. 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz), welches für die invasive Zellvariante spezifisch war. Dieses Fragment 1 wurde in der Northern Blot Analyse (siehe unten) als Sonde verwendet.

Beispiel 3

Northern Blot Analysen

Zur Überprüfung des Expressionsmusters für das DDRT-PCR-Fragment 1 wurden Northern Blot Analysen durchgeführt. Dazu wurden 20 µg Gesamt-RNA bzw. 4 µg PolyA⁺-RNA in 1%igen denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt und über Nacht auf eine Nylonmembran übertragen. Die RNA wurde durch Bestrahlung mit UV-Licht auf der Membran fixiert. Die Hybridisierung mit ³²P-markierten Sonden (Markierung mittels RPL-Kit der Firma Amersham) erfolgte über Nacht in einer formamidhaltigen Hybridisierungslösung bei 42°C. Anschließend wurde die Membran mit steigender Stringenz gewaschen, bis eine punktuelle Intensität der radioaktiven Strahlung meßbar war. Die Darstellung des Hybridisierungsmusters erfolgte durch Auflegen eines Röntgenfilms (NEF-NEN: Firma DuPont) und Exposition über mehrere Tage. Zur Bestimmung des Expressionsmusters für DDRT-PCR-Fragment 1 wurden Northern Blot Analysen mit RNA aus folgenden Zellen bzw. Geweben durchgeführt:

- invasive Zellen der epithelialen Endometriosezelllinie EEC145T⁺ (Passage 17)
- nicht invasive Zellen der epithelialen Endometriosezelllinie EEC145T⁺ (Passage 33)
- Zellen der peritonealen Zelllinie EEC143T⁺
- Endometriumgewebe
- Zellen der invasiven humanen Blasenkarzinomzelllinie EJ28
- Zellen der nichtinvasiven humanen Blasenkarzinomzelllinie RT112.

Nach Hybridisierung mit der Sonde für DDRT-PCR-Fragment 1 konnte eine etwa 4 kb große mRNA detektiert werden, die ausschließlich in der invasiven Variante der Endometriosezelllinie EEC145T⁺ nachgewiesen werden konnte. Es wurden weitere humane Gewebe getestet. In der Milz fand sich eine mRNA von 4 kb Länge, die mit Fragment 1 eindeutig hybridisierte, und in Hirn mRNAs von jeweils 4 kb und > 9 kb Länge.

Beispiel 4

RT-PCR

Eine sensible Methode zur Überprüfung des Expressionsmusters bietet die RT-PCR (Reverse Transcription PCR). Dazu wurden 1 µg der jeweiligen PolyA⁺-RNA mit Hilfe von 400 U M-MLV Reverse Transkriptase (Firma Gibco-BRL) in einem Gesamtvolumen von 30 µl in cDNA umgeschrieben. 1 µl davon wurde zur anschließenden PCR mit unterschiedlichen Primerkombinationen eingesetzt.

Die verwendeten PCR-Primer P1 bis P7 sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1

Nummer	Sequenz (Nucleotidposition bezogen auf SEQ ID NO. 1)
P1	5'-CCAGCTGCTGCCAAATCC-3' (36-53)
P2	5'-CATCATGGTCATAGCTGC-3' (545-562)
P3	5'-AGCGTCTCATCGGTGTAC-3' (793-776, Rückwärtsprimer)
P4	5'-AACAGAAGTGGTAGGTGC-3' (1080-1063, Rückwärtsprimer)
P5	5'-AAAGGGACGGGAGGAAGC-3' (1243-1260)
P6	5'-CCAAAGTAGAAAACACTG-3' (1612-1595, Rückwärtsprimer)
P7	5'-GCTTGTATGACACACACG-3' (2150-2133, Rückwärtsprimer)

Es wurden mit PolyA⁺-RNA aus verschiedenen Zelllinien und Geweben RT-PCR-Experimente unter Verwendung verschiedener Primerkombinationen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2

5	PK	P17	P33	Per	EM	EJ28	RT112	E	EE	PEE
	P1+P4	+	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
10	P2+P6	+	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
	P5+P7	+	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
15										
	P5+P6	+	-	-	+	-	-	+	+	+
20	P1+P3	+	-	-	+	-	-	+	+	+
25										

25

- PK = Primerkombination
- 30, P17 = Endometriosezelllinie EEC145T, Passage 17, invasiv
- P33 = Endomteriosezelllinie EEC145T, Passage 33, nicht invasiv
- Per = Peritoneumszelllinie Per143T
- 35, EM = Endometriumgewebe
- EJ28 = invasive Blasenkarzinomzelllinie
- RT112 = nicht invasive Blasenkarzinomzelllinie
- 40, E = Endometriumgewebe
- EE = Endometriumgewebe einer Endometriosepatientin
- 45, PEE = peritoneale Endometriosebiopsie
- n.g. = nicht getestet

50 Die RT-PCR Ergebnisse bestätigten die für Fragment 1 spezifische Expression in den frühen Passagen (Passage 17, Passage 20) der Endometriosezelllinie EEC145T⁺. Abweichend zu den Northern Blot Analysen konnte zusätzlich eine schwache Expression im Endometrium gezeigt werden.

Beispiel 5

55

Herstellung der cDNA-Phagenbank EEC14

Die cDNA-Phagenbank EEC14 wurde nach der Methode von Short, J.M. et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16: 7583-7600, hergestellt.

60 Zunächst erfolgte die Reverse Transkription von PolyA⁺-RNA invasiver Zellen (Passage 17) der epithelialen Endometriosezelllinie EEC145T⁺. Der hierzu verwendete Primer setzt sich aus einer XhoI-Schnittstelle sowie einer 18 Nukleotide langen poly(dT)-Sequenz zusammen. Ein Adaptor, der eine EcoRI-Schnittstelle beinhaltet, wurde an die entstandenen cDNA-Fragmente ligiert. Die beiden Restriktionsschnittstellen erlauben eine gerichtete Insertion der cDNA-Fragmente in den ZAP ExpressTM Vektor. Inserts können in Form eines Kanamycin-resistenten pBK CMV Phagemids aus dem Pha-

65 gen herausgeschnitten werden.

Beispiel 6

Phagenbankscreening

Das DDRT-PCR-Fragment 1 (394 bp) wurde als Sonde verwendet, um 10^6 pfu (plaque forming units) der cDNA-Phagenbank EEC14 laut Herstellerprotokoll (Firma Stratagene) zu durchmustern. Die Markierung der Sonde mit Digoxigenin (Firma Boehringer Mannheim) erfolgte mit Hilfe der PCR. Die nach Infektion des Bakterienstamms XL1 blue MRF entstandenen Plaques wurden auf eine Nylonmembran übertragen und auf dieser mit der o.g. Sonde hybridisiert. Der Nachweis der hybridisierten, Digoxigenin-markierten Sonde erfolgte nach dem Chemilumineszenz-Protokoll der Firma Boehringer Mannheim.

Positive Plaques wurden ausgewählt und einem Rescreening unterzogen. Die im Rescreening positiven Plaques wurden zur Excision eingesetzt. Durch Herausschneiden des Vektoranteils aus dem Phage mittels ExAssist Helferphagen entstanden Kanamycin-resistente pBK CMV Phagemide, die nach Vermehrung im Bakterienstamm XL0LR™ isoliert und sequenziert werden konnten. Der isolierte Phagemidklon Q2A enthielt mit einer Größe von 2,3 kb das längste Insert, dessen Sequenz bestimmt wurde und SEQ ID NO. 1 gezeigt ist. Die Sequenz des DDRT-PCR-Fragments 1 findet sich in den Nukleotiden 1235 bis 1628.

Beispiel 7

Southern blot Analyse

10 µg genomische DNA von weiblichen und männlichen Personen wurde mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die Fragmente wurden im Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Auf dieser Membran erfolgte die Hybridisierung mit dem Digoxigenin markierten DDRT-PCR-Fragment 1.

Die Hybridisierung konnte durch Chemilumineszenz laut Protokoll der Firma Boehringer nachgewiesen werden. Bei Verwendung unterschiedlicher Restriktionsendonukleasen wurde sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen DNA-Proben nur jeweils eine Bande detektiert. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß das dem Fragment 1 zu Grunde liegende Gen ein singuläres, geschlechtsunspezifisches Gen ist. Mittlerweile wurden mit dem DDRT-PCR-Fragment 1 zwei genomische Klone PAC J1472 und PAC N1977 isoliert.

Beispiel 8

Fluorescence In Situ Hybridisation (FISH)

Die in Beispiel 7 gewonnenen genomischen Klone wurden mittels der Fluoreszenz- in situ-Hybridisierung auf Chromosom 1 (1p36) lokalisiert (Lichter et al. (1990), Science 247: 64-69).

Beispiel 9

Herstellung Fragment 1-spezifischer Antikörper

Die Nukleotide 584 bis 909 der o.g. cDNA-Sequenz wurden über geeignete Restriktionsschnittstellen in den Expressionsvektor pMAL cRI kloniert. Zur Expression der Sequenz wurde das Konstrukt in E.coli DHS α-Zellen transformiert. Das translatierte Proteinfsegment wurde aus dem SDS-Polyacrylamid-Gel ausgeschnitten und zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt.

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: Starzinski-Powitz, Anna, Prof. Dr.
 (B) STRASSE: Zeisselstr. 9
 (C) ORT: Frankfurt
 (E) LAND: DE
 (F) POSTLEITZAHL: 60318

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Neues
 Endometriose-assoziiertes Gen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk
 (B) COMPUTER: IBM PC compatible
 (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 2204 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: beides
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LÄNGE: 3..911

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CC GCC CTC GTG CCC AAG GCA GGA CTG GCC AAG CCC CCA GCT GCT GCC	47
Ala Leu Val Pro Lys Ala Gly Leu Ala Lys Pro Pro Ala Ala Ala	
1 5 10 15	
AAA TCC AGC CCT TCC CTC GCC TCT TCG TCC TCG TCC TCG TCC TCC GCG	95
Lys Ser Ser Pro Ser Leu Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala	
20 25 30	
GTG GCC GGT GGG GCC CCG GAG CAG CAG GCC CTC CTG AGG AGG GGC AAG	143
Val Ala Gly Gly Ala Pro Glu Gln Gln Ala Leu Leu Arg Arg Gly Lys	
35 40 45	
AGG CAC CTG CAG GGG GAC GGT CTC AGC AGC TTC GAC TCC AGA GGC AGC	191
Arg His Leu Gln Gly Asp Gly Leu Ser Ser Phe Asp Ser Arg Gly Ser	
50 55 60	
CGG CCC ACC ACA GAG ACT GAG TTC ATC GCC TGG GGG CCC ACG GGG GAC	239
Arg Pro Thr Thr Glu Thr Glu Phe Ile Ala Trp Gly Pro Thr Gly Asp	
65 70 75	
GAG GAG GCC CTG GAG TCC AAC ACA TTT CCG GGC GTT TAC GGC CCC ACC	287
Glu Glu Ala Leu Glu Ser Asn Thr Phe Pro Gly Val Tyr Gly Pro Thr	
80 85 90 95	
ACG GTC TCC ATC CTA CAA ACA CGG AAG ACA ACT GTG GCC GCC ACC ACC	335
Thr Val Ser Ile Leu Gln Thr Arg Lys Thr Thr Val Ala Ala Thr Thr	
100 105 110	

DE 198 24 230 A 1

ACC ACC ACC ACC ACG GCC ACC CCC ATG ACG CTG CAG ACT AAG GGG TTC Thr Thr Thr Thr Thr Ala Thr Pro Met Thr Leu Gln Thr Lys Gly Phe 115 120 125	383	
ACC GAG TCC TTG GAT CCC CGG AGA AGG ATC CCA GGT GGG GTT AGC ACA Thr Glu Ser Leu Asp Pro Arg Arg Arg Ile Pro Gly Gly Val Ser Thr 130 135 140	431	5
ACG GAG CCT TCC ACC AGT CCC AGC AAC AAC GGG GAA GTC ACC CAG CCC Thr Glu Pro Ser Thr Ser Pro Ser Asn Asn Gly Glu Val Thr Gln Pro 145 150 155	479	10
CCA AGG ATT CTG GGG GAG GCC TCA GGT CTG GCT GTC CAT CAG ATC ATC Pro Arg Ile Leu Gly Glu Ala Ser Gly Leu Ala Val His Gln Ile Ile 160 165 170 175	527	15
ACC ATC ACC GTC TCC CTC ATC ATG GTC ATA GCT GCT CTC ATC ACA ACT Thr Ile Thr Val Ser Leu Ile Met Val Ile Ala Ala Leu Ile Thr Thr 180 185 190	575	
CTT GTC TTA AAA AAT TGC TGT GCC CAA AGC GGG AAC ACT CGT CGG AAC Leu Val Leu Lys Asn Cys Cys Ala Gln Ser Gly Asn Thr Arg Arg Asn 195 200 205	623	20
AGC CAC CAG CGG AAG ACC AAC CAG CAG GAG GAG AGC TGC CAG AAC CTC Ser His Gln Arg Lys Thr Asn Gln Gln Glu Glu Ser Cys Gln Asn Leu 210 215 220	671	25
ACG GAC TTC CCC TCG GCC CGG GTG CCC AGC AGC CTG GAC ATA TTC ACG Thr Asp Phe Pro Ser Ala Arg Val Pro Ser Ser Leu Asp Ile Phe Thr 225 230 235	719	30
GCC TAT AAC GAG ACC CTG CAG TGT TCT CAC GAG TGC GTC AGG GCA TCT Ala Tyr Asn Glu Thr Leu Gln Cys Ser His Glu Cys Val Arg Ala Ser 240 245 250 255	767	35
GTG CCC GTG TAC ACC GAT GAG ACG CTG CAC TCG ACG ACG GGG GAG TAC Val Pro Val Tyr Thr Asp Glu Thr Leu His Ser Thr Thr Gly Glu Tyr 260 265 270	815	
AAA TCC ACA TTT AAT GGA AAC CGA CCC TCC TCT TCT GAT CGG CAT CTT Lys Ser Thr Phe Asn Gly Asn Arg Pro Ser Ser Ser Asp Arg His Leu 275 280 285	863	40
ATT CCT GTG GCC TTC GTG TCT GAG AAA TGG TTT GAA ATC TCC TGC TGA Ile Pro Val Ala Phe Val Ser Glu Lys Trp Phe Glu Ile Ser Cys * 290 295 300	911	45
CTGGCCGAAG TCTTTTTTAC CTCCTGGGGG CAGGGCAGAC GCCGTGTGTC TGTTTTCACGG	971	
ATTCCGTTGG TGAACCTGTA AAAACAAAAC AAACAAAACA AAACAAAAAA GACAAAACCT	1031	
AAACTGAGC TATCTAAGGG GGAGGGTCCC CGCACCTACC ACTTCTGTTT GCCGGTGGGA	1091	50
AACTCACAGA GCAGGACGCT CTAGGCCAAA TCTATTTTTG TAAAAATGCT CATGCCTATG	1151	
GGTGACTGCC TTCTCCCAGA GTTTTCTTTG GAGAACAGAA AGAAGAAAGG AAAGAAAGGA	1211	55
ACCAGAGGCA GAGAGACGAG GATACCCAGC GAAAGGGACG GGAGGAAGCA TCCGAAACCT	1271	
AGGATTCGTC CTACGATTCT GAACCTGTGC CAATAATACC ATTATGTGCC ATGTACTGAC	1331	
CCGAAAGGCT CGGCCACAGA GCCGGGGCCC AGCGAATCAC GCAGAGAAAT CTTACAGAAA	1391	60
ACAGGGGTGG GAATCTCTTC CGATAGAGTC GCTATTTCTG GTTAATATAC ATATATAAAT	1451	
ATATAAATAC AAACACACAC ACACACTTTT TTTGTACTGT AGCAATTTTT GAAGATCTTA	1511	
AATGTTCTTT TTTAAAAAAA AGAATTGTGT TATAGGTAC AAAATCTGAT TTATTTAACA	1571	65

DE 198 24 230 A 1

TGCTTAGTAT GAGCAGAATA AACCAGTGTT TTCTACTTTG GCAACTCACG TCACACACAT 1631
 ATTACACACA TGTGCGCATA CACACACACA ATACACATAT ATGCATATAG ACGCATCTAT 1691
 5 TGGAAATGCA GTTCCACAGG TGAGCATGTT CTTTCTGGTG ACCTGGTATT CCATCACCAT 1751
 TCACCCCAGG GGACAGCCTC GACCGAGACA AGGAGGCCCT TAAATGACAG CCTGCATTTG 1811
 CTAGACGGTT GGTGAGTGGC ATCAAATGTG TGACTTACTA TCTTGGGCCA GAACTAAGAA 1871
 10 TGCCAAGGTT TTATATATGT GTGTATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATGTTTGTGT 1931
 GTGTATATAT ATATATATAT ATATATGTTT GTGTGTGTAT ATATATGTTT GTGTATATAT 1991
 15 ATACACATAT GCATACATAT GATTTTTTTT TTTTCATTTA AGTGTGGAA GATGCTACCT 2051
 AACAGCCACG TTCACATTTA CGTAGCTGGT TGCTTACAAA CGGGCCTGAG CCCCTGGTTG 2111
 GGTGGGTGGT GGATTCTTGG ACGTGTGTGT CATAACAAGCA TAGACTGGAT TAAAGAAGTT 2171
 20 TTCCAGTTCC AAAAATTAAA GGAATATATC CTT 2204

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

25 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 303 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

30 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Ala Leu Val Pro Lys Ala Gly Leu Ala Lys Pro Pro Ala Ala Ala Lys
 1 5 10 15
 35 Ser Ser Pro Ser Leu Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Val
 20 25 30
 Ala Gly Gly Ala Pro Glu Gln Gln Ala Leu Leu Arg Arg Gly Lys Arg
 35 40 45
 40 His Leu Gln Gly Asp Gly Leu Ser Ser Phe Asp Ser Arg Gly Ser Arg
 50 55 60
 Pro Thr Thr Glu Thr Glu Phe Ile Ala Trp Gly Pro Thr Gly Asp Glu
 45 65 70 75 80
 Glu Ala Leu Glu Ser Asn Thr Phe Pro Gly Val Tyr Gly Pro Thr Thr
 85 90 95
 50 Val Ser Ile Leu Gln Thr Arg Lys Thr Thr Val Ala Ala Thr Thr Thr
 100 105 110
 Thr Thr Thr Thr Ala Thr Pro Met Thr Leu Gln Thr Lys Gly Phe Thr
 115 120 125
 55 Glu Ser Leu Asp Pro Arg Arg Arg Ile Pro Gly Gly Val Ser Thr Thr
 130 135 140
 Glu Pro Ser Thr Ser Pro Ser Asn Asn Gly Glu Val Thr Gln Pro Pro
 145 150 155 160
 60 Arg Ile Leu Gly Glu Ala Ser Gly Leu Ala Val His Gln Ile Ile Thr
 165 170 175
 Ile Thr Val Ser Leu Ile Met Val Ile Ala Ala Leu Ile Thr Thr Leu
 65 180 185 190

Val	Leu	Lys	Asn	Cys	Cys	Ala	Gln	Ser	Gly	Asn	Thr	Arg	Arg	Asn	Ser		
	195						200					205					
His	Gln	Arg	Lys	Thr	Asn	Gln	Gln	Glu	Glu	Ser	Cys	Gln	Asn	Leu	Thr		5
	210					215					220						
Asp	Phe	Pro	Ser	Ala	Arg	Val	Pro	Ser	Ser	Leu	Asp	Ile	Phe	Thr	Ala		
225					230					235					240		
Tyr	Asn	Glu	Thr	Leu	Gln	Cys	Ser	His	Glu	Cys	Val	Arg	Ala	Ser	Val		10
				245					250					255			
Pro	Val	Tyr	Thr	Asp	Glu	Thr	Leu	His	Ser	Thr	Thr	Gly	Glu	Tyr	Lys		
			260					265					270				
Ser	Thr	Phe	Asn	Gly	Asn	Arg	Pro	Ser	Ser	Ser	Asp	Arg	His	Leu	Ile		15
		275					280					285					
Pro	Val	Ala	Phe	Val	Ser	Glu	Lys	Trp	Phe	Glu	Ile	Ser	Cys	*			
	290					295					300						20

Patentansprüche

1. Nukleinsäure, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie
 - (a) die in SEQ ID NO. 1 dargestellte Nukleotidsequenz oder einen Protein-kodierenden Abschnitt davon,
 - (b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz oder
 - (c) eine mit den Sequenzen aus (a) und/oder (b) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt,
 mit der Maßgabe, daß die Nukleinsäure verschieden ist von den mit den Zugangsnummern Z98886, Ac003017, Aa452993 und Aa452856 in der Datenbank EMBL EST angegebenen Sequenzen.
2. Nukleinsäure nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen Protein-kodierenden Abschnitt der in SEQ ID NO. 1 dargestellten Nukleotidsequenz umfaßt.
3. Nukleinsäure nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Homologie von mehr als 80% zu der in SEQ ID NO. 1 dargestellten Nukleotidsequenz oder einem Abschnitt davon aufweist.
4. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie für ein mit invasiven Prozessen assoziiertes Polypeptid oder einen Abschnitt davon kodiert.
5. Modifizierte Nukleinsäure oder Nukleinsäureanalogon, die/das eine Nukleotidsequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 4 umfaßt.
6. Polypeptid, dadurch gekennzeichnet, daß es von einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 4 kodiert ist, wobei die Maßgabe von Anspruch 1 nicht zu berücksichtigen ist.
7. Polypeptid nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß es
 - (a) die in SEQ ID NO. 2 dargestellte Aminosäuresequenz oder
 - (b) eine Homologie von mehr als 70% zu der Aminosäuresequenz gemäß (a) aufweist.
8. Modifiziertes Polypeptid, das eine Aminosäuresequenz nach Anspruch 6 oder 7 umfaßt.
9. Peptid, dadurch gekennzeichnet, daß es einen mindestens 10 Aminosäuren langen Abschnitt der in SEQ ID NO. 2 dargestellten Aminosäuresequenz darstellt.
10. Vektor, dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder einen Abschnitt davon aufweist.
11. Vektor nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß er die Expression der Nukleinsäure in einer geeigneten Wirtszelle ermöglicht.
12. Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder einem Vektor nach Anspruch 10 oder 11 transformiert ist.
13. Antikörper gegen ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 6 bis 8 oder gegen ein Peptid nach Anspruch 9.
14. Antikörper nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß er gegen das gesamte Polypeptid oder gegen ein Fragment davon ausgewählt aus einem Abschnitt der Aminosäuren 1 bis 302 aus SEQ ID NO. 2 gerichtet ist.
15. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß sie als aktive Komponente umfaßt:
 - (a) eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Maßgabe von Anspruch 1 nicht zu berücksichtigen ist,
 - (b) einen Vektor nach Anspruch 10 oder 11,
 - (c) eine Zelle nach Anspruch 12,
 - (d) ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 6 bis 8,
 - (e) ein Peptid nach Anspruch 9 und/oder
 - (f) einen Antikörper nach Anspruch 13 oder 14.
16. Zusammensetzung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß sie weiterhin pharmazeutisch übliche Träger-, Hilfs- und/oder Zusatzstoffe enthält.
17. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 6 bis 8 oder von Fragmenten dieses Polypeptids als

Immunogen zur Herstellung von Antikörpern.

18. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 15 oder 16 zur Diagnostik von Erkrankungen, die mit invasiven Prozessen zusammenhängen.

5 19. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 15 oder 16 zur Diagnostik einer Prädisposition für Erkrankungen, die mit invasiven Prozessen zusammenhängen.

20. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 15 oder 16 zur Therapie oder Prävention von Erkrankungen, die mit invasiven Prozessen zusammenhängen.

21. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 15 oder 16 zur Diagnostik, Therapie oder Prävention von Endometriose.

10 22. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 15 oder 16 zur Diagnostik, Therapie oder Prävention von Tumorerkrankungen.

23. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 15 oder 16 als Mittel für die Gentherapie.

24. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 15 oder 16 als Antisense-Inhibitor.

25. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 15 oder 16 bei der Implantation von Embryonen.

15 26. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 15 oder 16 zur Identifizierung von Inhibitoren von einem Polypeptid nach einem der Ansprüche 6 bis 8 und/oder von Inhibitoren von Molekülen, welche in der Lage sind, an das Polypeptid zu binden.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ENDEBLATT

DRUCKAUFTRAGS-ID: 3253

Benutzer: anmuenzb
Drucker: gdHOE320
Job Beginn: 12.06.2001 15:30
Job Ende: 12.06.2001 15:30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 99/06656

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although claims 42 and 43 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter. Application No

PCT/US 99/06656

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0390323 A	03-10-1990	DE 69032864 D	11-02-1999
		DE 69032864 T	27-05-1999
		JP 4004898 A	09-01-1992
		US 5527676 A	18-06-1996
WO 9519369 A	20-07-1995	US 5677125 A	14-10-1997
		AU 1831795 A	01-08-1995
		CA 2210396 A	20-07-1995
		EP 0804453 A	05-11-1997
WO 9418992 A	01-09-1994	AT 178490 T	15-04-1999
		AU 682854 B	23-10-1997
		AU 6272294 A	14-09-1994
		CA 2152941 A	01-09-1994
		DE 69417734 D	12-05-1999
		EP 0689447 A	03-01-1996
		JP 8507076 T	30-07-1996
		US 5801029 A	01-09-1998
		US 5846945 A	08-12-1998
		US 5677178 A	14-10-1997
		US 5856181 A	05-01-1999
WO 9901581 A	14-01-1999	AU 8382998 A	25-01-1999